

明 細 書

蛍光測定装置

技術分野

[0001] この発明は、励起光が照射された試料から発生する蛍光を検出する蛍光測定装置に関するものである。

背景技術

[0002] 医薬品工業、食品工業、化学工業及び農林水産業等の幅広い分野において、新薬の研究開発、酵素のスクリーニング、生理活性物質等の生体内微量機能物質の分析等を行うに際、蛍光を測定することにより試料分析が行われている。バイオ関連分野で重要な核酸や蛋白質等の生体試料を分析する場合には、測定対象である生体試料が微量しかないことが多く、また、試料定量も重要であることから、例えば、次に示すような方法により分析が行われる。

[0003] すなわち、従来の蛍光測定では、図9に示されたようなピペット10及びチップ30が用いられていた。ピペット10の先端に装着されたチップ30内に試料が計り取られ、この試料が特別な微量測定用セルに移し替えられる。そして、この試料が容れられたセルに対して側方から励起光が照射され、この試料から放出される蛍光のうちセルの側方(ただし、励起光照射方向とは異なる方向)に出た蛍光が光検出器により検出される。

[0004] 特許文献1に開示された方法では、試料が容れられたセルに対して上方から励起光が照射され、この試料から放出される蛍光のうちセルの上方に出た蛍光が光検出器により検出される。

[0005] また、特許文献2に開示された方法では、試料が容れられたセルに対して上方から励起光が照射され、この試料から放出される蛍光のうちセルの下方に出た蛍光が光検出器により検出される。

特許文献1:特開平5-38297号公報

特許文献2:特開2002-71566号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 発明者らは、上述のような従来の蛍光測定について詳細に検討した結果、以下のような課題を発見した。
- [0007] すなわち、従来の蛍光測定のように試料をチップからセルに移し替えて蛍光測定を行う場合、一般的に高価なセルは、繰り返し使用するために使用後に洗浄・乾燥しなければならない。したがって、セルは、洗浄等の際に破損の可能性がある、取り扱いが容易でない。また、セルは、再使用されることからコンタミネーションが発生する可能性がある一方で、十分に洗浄することが容易でない。
- [0008] また、試料は蛍光測定後に別の反応が行われる場合には、蛍光測定のためにセルに容れられた試料を回収する必要がある。しかしながら、従来の蛍光測定では、試料の回収率が不十分であり、加えて、回収に伴う試料のコンタミネーションが発生する可能性があった。また、チップからセルへの試料の移し替えやセルの洗浄や乾燥等に時間を要する。
- [0009] さらに、セルに容れられる試料の量は一般に100 μ l(マイクロリットル)程度であり、試料が極微量しかない場合には、試料を希釈する必要がある。また、その貴重な試料をセルから完全に回収することは困難である。
- [0010] このように、セルに試料を移し替えて蛍光測定することは、様々な課題を有している。このセルを用いた蛍光測定の解消手段として、セルに移し替えられること無くチップ先端に試料が計り取られた状態で、このチップ先端に対して側方から励起光を照射して、試料から放出される蛍光のうちチップの側方(ただし、励起光照射方向とは異なる方向)の蛍光を光検出器により検出することも考えられる。この場合、チップ先端に計り取られる試料は微量であり、また、一般にチップは安価であって1回限り使用されることから、セルを使用する場合のような課題はない。しかしながら、チップの断面形状が円形であることから、チップによる励起光の散乱が大きく、そのため、蛍光測定には不適である。
- [0011] この発明は上述のような課題を解決するためになされたものであり、短時間で容易に微量試料の蛍光測定を可能にするための構造を備えた蛍光測定装置を提供することを目的としている。

課題を解決するための手段

- [0012] この発明に係る蛍光測定装置は、励起光源と、ピペット装置と、該ピペット装置の先端に装着されたチップと、蛍光検出システムを備える。上記励起光源は、所定波長の励起光を出力する。上記ピペット装置は、第1内部空間を有するピペットと、ピペットアダプタから構成されており、上記チップは、第2内部空間を有するとともに、吸入口が先端に設けられている。ピペットアダプタは、上記ピペットと上記チップとの間に配置されるとともに、該ピペットの第1内部空間と上記チップの第2内部空間とを連絡する第3内部空間を有する。また、ピペットアダプタは、励起光源から第3内部空間内に射出された励起光を試料が存在する上記チップの吸入口側に導くための励起光導入構造を有する。そして、上記蛍光検出システムは、励起光照射により、上記試料から発せられた蛍光を検出する。なお、蛍光測定に際し、使用される試料が微量の場合、チップ先端の吸入口から吸入された試料は、該吸入口が設けられたチップの先端で保持される。一方、ある程度の量の試料が使用可能な場合、チップ先端の吸入口から吸入された試料は、該吸入口が設けられたチップの先端を含む該チップの第2内部空間内で保持される。
- [0013] 上述のような構造を備えた蛍光測定装置において、ピペットアダプタがピペットとチップに装着された状態で、ピペットアダプタ、ピペット及びチップそれぞれの内部空間は連続している。チップの先端にある吸入口付近に試料が計り取られた状態で、これら相互に装着されたピペットアダプタ、ピペット及びチップは所定位置に配置される。そして、励起光源から出力された励起光が励起光導入構造により、ピペットアダプタの外部から第3内部空間に導かれ、上記チップの吸入口に向けて照射される（上記チップ内に保持された試料に対して液面上方から照射される）。この励起光照射により試料から発せられた蛍光が蛍光検出システムにより検出される。
- [0014] この発明に係る蛍光測定装置において、上記励起光導入構造は、ピペットアダプタの外部から該ピペットアダプタの内部空間（第3内部空間）に励起光を導入するための励起光導入窓と、励起光導入窓を介して該内部空間へ導入された励起光を上記チップの吸入口に向けて反射させる反射鏡とを含むのが好ましい。この場合、励起光は、ピペットアダプタの外部から励起光導入窓を介して内部空間に導入され、反射鏡

により反射されてチップの吸入口に向けて照射される。

[0015] この発明に係る蛍光測定装置において、上記励起光導入構造は、ピペットアダプタの外部から先端部分が挿入された光ファイバを備えてもよい。この光ファイバの一端は、ピペットアダプタの内部空間内に位置し、該一端から上記チップの吸入口に向けて励起光が出射される。この場合、励起光は、ピペットアダプタの外部から光ファイバを伝搬してピペットアダプタの内部空間にある光ファイバの一端から上記チップの試料吸入口に向けて照射される。また、当該蛍光測定装置は、光ファイバの該一端の近傍に設けられ励起光を集光する光学系をさらに備えてもよい。

[0016] この発明に係る蛍光測定装置において、上記励起光導入構造は、ピペットアダプタの外部からピペットアダプタの内部空間に導入される励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択して上記チップの吸入口に向けて照射する第1光フィルタをさらに含むのが好ましい。この場合、蛍光測定にとって不要な波長成分の試料照射が低減されるので、上記チップ内における試料温度の上昇が効果的に防止される。

[0017] この発明に係る蛍光測定装置において、上記蛍光検出システムは、試料から到達した光のうち蛍光を選択的に取り出す蛍光分離部と、この蛍光分離部により取り出された蛍光を検出する光検出器とを含むのが好ましい。この場合、励起光照射により試料から発せられた蛍光は、蛍光分離部により選択的に取り出されて、光検出器により検出される。

[0018] ここで、上記蛍光分離部は、上記励起光導入構造による励起光照射の光軸上であって試料の後方(上記チップの外部)に設けられた、蛍光を選択的に透過させる第2光フィルタを含んでもよい。この構成において、光検出器が該第2光フィルタを透過した蛍光を検出する。この場合、第2光フィルタには、試料から発せられた蛍光だけでなく、試料を透過した励起光も到達する。そのうち励起光は第2光フィルタにより遮断される一方、蛍光は第2光フィルタを透過して光検出器により検出される。また、当該蛍光測定装置は、励起光の光軸上からの該第2光フィルタを待避させるための構造を備える。該第2光フィルタ自体の移動は手動で行われても、また、モータなどの駆動手段によって実現されてもよい。このような第2光フィルタの退避構造をさらに備えた蛍光測定装置は、試料の吸光度を測定する際にも用いられ得るので、等しい条件

下における蛍光測定データ及び吸光度測定データを得ることができる。

- [0019] 上記蛍光分離部は、励起光源と励起光導入構造との間に配置されたダイクロイックミラーを含んでもよい。このダイクロイックミラーは、励起光源からの励起光を透過させる一方、試料からの蛍光を反射させる。この構成において、光検出器が該ダイクロイックミラーにより反射された蛍光を検出する。この場合、試料から発せられた蛍光のうち励起光照射方向とは逆の方向に進む成分が、ダイクロイックミラーにより反射される（光検出器により検出される）。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は蛍光とともにダイクロイックミラーに到達するが、このダイクロイックミラーは蛍光を選択的に反射させるので、散乱光は光検出器に入射しない。
- [0020] 上記蛍光分離部は、上記チップの外部であって励起光の光軸上とは異なる位置に設けられた、蛍光を選択的に透過させる第3光フィルタを含んでもよい。この構成において、光検出器が該第3光フィルタを透過した蛍光を検出する。この場合には、試料で発生した蛍光のうち第3光フィルタに入射したものは、この第3光フィルタを透過して光検出器により検出される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は、蛍光とともに第3光フィルタに入射するが、この第3光フィルタにより遮断される。
- [0021] 蛍光分離部が上述のような第2あるいは第3光フィルタを含む場合、上記蛍光検出システムは、試料から到達した光をコリメートしてこれら第2あるいは第3光フィルタへ入射させるコリメート光学系をさらに含むのが好ましい。この場合、光フィルタへ光を垂直に入射させることができるので、光フィルタの実際の透過特性が設計どおりに得られて、蛍光は高い透過率で透過し得る一方で、励起光は高い遮断率で遮断され得る。
- [0022] この発明に係る蛍光測定装置において、上記ピペットアダプタは、上記チップの装着位置を規定する位置決め構造をさらに有してもよい。この場合、常に一定の状態でチップがピペットアダプタに装着されるため、チップの差込具合による蛍光測定位置の変動がなく、チップは蛍光測定装置の所定位置に再現性よく配置され得る。
- [0023] なお、この発明に係る各実施例は、以下の詳細な説明及び添付図面によりさらに

十分に理解可能となる。これら実施例は単に例示のために示されるものであって、この発明を限定するものと考えるべきではない。

- [0024] また、この発明のさらなる応用範囲は、以下の詳細な説明から明らかになる。しかしながら、詳細な説明及び特定の事例はこの発明の好適な実施例を示すものではあるが、例示のためにのみ示されているものであって、この発明の思想及び範囲における様々な変形及び改良はこの詳細な説明から当業者には自明であることは明らかである。

発明の効果

- [0025] この発明によれば、短時間で容易に微量試料の蛍光測定が可能になる。
- [0026] 具体的には、微量な物質の蛍光を測定する場合、従来技術ではマイクロセルと呼ばれる蛍光測定用の高価なセルが必要であったが、この発明では特別なセルが不要になる。したがって、この発明に係る蛍光測定装置は、セルへの試料の移動、セルの洗浄、乾燥等、時間のかかる一切の作業をなくすことを可能にする。
- [0027] また、従来の蛍光測定では最少量でも100 μ l(マイクロリットル)程度の試料容量が必要であったため、試料を希釈せざるを得ず、或いは、試料自体を大量に必要とした。しかしながら、この発明に係る蛍光測定装置は、数 μ l〜数十 μ lと極微量の試料容積で蛍光測定が可能のため、試料を希釈する必要がなくなるばかりでなく、蛍光測定に必要な試料の量を激減できる。しかも、当該蛍光測定装置は、次の作業で測定された試料をそのまま利用可能にするので、試料のムダが完全になくなる。
- [0028] さらに、数 μ l〜数十 μ lの極微量で蛍光物質が含まれているかどうかの判定を迅速かつ簡便にできるため、バイオ試料の電気泳動やHPLCによる分離作業の前に予め蛍光物質が間違いなく含まれているかどうかを予備的に確認することができる。また、バイオ試料の分離後、どの分画に目的とする蛍光(標識)物質が含まれているかを容易に知ることができ、作業の高効率化に役立つ。
- [0029] 特に多検体の蛍光測定の場合、この発明に係る蛍光測定装置は有効であり、例えば酵素反応の最適化条件の検討、酵素反応の経時的モニタリング、酵素阻害剤のスクリーニング等に適用され得る。
- [0030] さらに、この発明に係る蛍光測定装置は、吸光度と蛍光とを測定できるため、例え

ば、核酸あるいはタンパク質の吸光度と蛍光標識色素の蛍光とが同時に測定可能になる。そのため、ある分画に蛍光標識化された核酸あるいはタンパク質が含まれているかどうかの確認が可能になる。

[0031] この発明によれば、バイオ分野の研究者が最もなじみ深いピペットを用いて、ごく通常の方法で、極微量の液滴が空気中に非常に容易に保持可能になる。

[0032] 従来技術のように試料に対してチップの側方からの励起では、チップ自体によって大きな散乱が起こってしまう。また、試料の下方からの励起では、チップ先端近傍での散乱を伴ってしまう。これに対し、この発明に係る蛍光測定装置は、試料に対して液面上方から励起光を入射するため（励起光にチップ内を伝搬させる）、チップ自体による励起光の散乱を最小化することができる。

[0033] 試料である液滴をガラス基板上に滴下し、この試料に例えば光ファイバを用いて励起光を照射することで、該試料から発せられた蛍光を検出する方法が考えられるが、バイオ分野では、コンタミネーションの問題があるので、ピペットから滴下された試料は再び回収されても次の実験には使用できない。また、この回収も完全には行えない。これに対し、この発明に係る蛍光測定装置は、簡便に、迅速に、しかも何らコンタミネーションを起こさず、無駄のない蛍光測定を可能にする。

図面の簡単な説明

[0034] [図1]は、この発明に係る蛍光測定装置に適用可能なピペット装置の構成を示す図である。

[図2]は、図1に示されたピペットアダプタの構成を示す断面図である。

[図3]は、この発明に係る蛍光測定装置の第1実施例の構成を示す図である。

[図4]は、この発明に係る蛍光測定装置の第2実施例の構成を示す図である。

[図5]は、この発明に係る蛍光測定装置の第3実施例の構成を示す図である。

[図6]は、ピペットの位置決め方法を説明するための図である。

[図7]は、ピペットアダプタの変形例の構成を示す断面図である。

[図8]は、第3実施例に係る蛍光測定装置を用いた蛍光測定の結果を示すグラフである。

[図9]は、ピペット及びチップの従来の構成を示す図である。

符号の説明

[0035] 1〜3…蛍光測定装置、4…ピペット装置、10…ピペット、20、120…ピペットアダプタ、21、121…ピペット装着部、22、122…チップ装着部、23…励起光導入窓、24…反射鏡、24a…バンドパスフィルタ、25、123…光ファイバ、26、42、51、124…レンズ、30…チップ、31…試料吸入口、41…励起光源、43…アパーチャ、44…ダイクロイックミラー、52…光フィルタ、53…光検出器、54…モータ、32、22a…ストッパ。

発明を実施するための最良の形態

[0036] 以下、この発明に係る蛍光測定装置の各実施例を、図1〜図8を用いて詳細に説明する。なお、図面の説明において同一の要素には同一の符号を付し、重複する説明を省略する。

[0037] まず、この発明に係る蛍光測定装置に適用されるピペット装置について説明する。図1は、この発明に係る蛍光測定装置に適用可能なピペット装置の構成を示す図である。なお、この図1には、ピペット装置4の先端に装着されたチップ30も示されている。また、図2は、図1に示されたピペット装置4の一部を構成するピペットアダプタ20の構成を示す断面図である。

[0038] 図1において、ピペット装置4は、ピペット10及びピペットアダプタ20により構成される。図9に示された従来の装置と比較すると、図1のピペット装置4は、ピペット10とチップ30との間にピペットアダプタ20が設けられる点で異なる。ピペット10及びチップ30それぞれは、既存のものが利用可能である。なお、ピペット10とピペットアダプタ20は、一体的に構成されてもよく、また、互いに別体であって着脱自在の構成でもよい。ただし、ピペット装置4は、一体的に構成された方が取り扱いが容易である。

[0039] ピペットアダプタ20は、図2に示されたように、ピペット10の先端が挿入されるピペット装着部21と、チップ30が装着されるチップ装着部22とを有している。そして、このピペットアダプタ20は、ピペット10とチップ30との間に装着可能である。ピペットアダプタ20は、その装着時にピペット10及びチップ30それぞれの内部空間を連絡する内部空間20Aを有している。ピペットアダプタ20とピペット10との間の接合、及び、ピペットアダプタ20とチップ30との間の接合は、チップ30内に試料を保持・静止させるた

め、共に気密性が高いことが必要とされる。したがって、ピペット装着部21及びチップ装着部22それぞれは、気密性に優れた材質である例えばゴム状物質や高分子でコーティングされていたり、また、特にピペット装着部21とピペット10との間においてゴム状物質からなるOリング等の気密性保持部材を挟み込んでいたりしているのが好ましい。

[0040] また、ピペットアダプタ20は、外部から内部空間20Aに励起光を導入するための励起光導入窓23と、その励起光導入窓23を介して内部空間20Aへ導入された励起光をチップ装着部22の開口を経てチップ30の吸入口31に向けて反射する反射鏡24とを備える。励起光導入窓23は、外部から内部空間20Aに導入する励起光のうち試料の蛍光測定に必要な所定波長帯域の成分のみを選択的に透過させる光フィルタであるのが好ましい。同様に、反射鏡24も、内部空間20Aに導入された励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択して反射する部材であるのが好ましい。あるいは、図2中に示されたように、当該蛍光測定装置1は、内部空間20Aに導入された励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択的に透過させるバンドパスフィルタ24aをピペットアダプタ20の内部空間20Aに備えてもよい。

[0041] 次に、この発明に係る蛍光測定装置の第1実施例について説明する。図3は、この発明に係る蛍光測定装置の第1実施例の構成を示す図である。この図3に示された蛍光測定装置1は、上述されたピペット10、ピペットアダプタ20及びチップ30に加えて、励起光源41、レンズ42、アパーチャ43、レンズ51、光フィルタ52、光検出器53及びモータ54を備える。

[0042] なお、光源41からアパーチャ43に到るまでの照射光学系と、レンズ51から光検出器53に到るまでの検出光学系とは、互いの相対的位置が固定されており、例えば、当該装置1の筐体内に固定配置される。そして、これらに対して、チップ30が装着されたピペット装置4は所定位置に着脱自在に配置される。所定位置にピペット装置4を着脱自在に配置するには、固定スタンド筐体に対して磁石を用いてピペット装置4を固定したり、筐体に設けられた孔にピペット装置4を挿嵌したりすればよい。このような構成により、ピペット装置4の適切な光学的配置が可能になる。

[0043] 励起光源41は、チップ30の吸入口31から計り取られて保持される試料に照射す

べき所定波長域の励起光を出力する。このような励起光源41としては、例えば、紫外光を出力する重水素ランプが適している。レンズ42は、励起光源41から出力された励起光をコリメートする。アパーチャ43は、レンズ42によりコリメートされた励起光の光束断面のうち一部を、ピペットアダプタ20の励起光導入窓23へ向けて透過させる。なお、励起光源41とピペットアダプタ20との間の励起光の光路上に、シャッタが設けられてもよい。この場合、試料への励起光の照射時間がシャッタにより制御されるので、試料に励起光が長時間照射されることに起因した試料温度の上昇が防止される。

[0044] レンズ51、光フィルタ52及び光検出器53は、反射鏡24から試料への励起光照射の光軸上であって、試料の後方(試料を挟んで反射鏡24の反対側)に設けられている。レンズ51は、チップ30の吸入口31に保持される試料から下方に放出された光をコリメートする。コリメートされた光は光フィルタ52へ到達する。レンズ51のコリメート作用を考慮すると、蛍光を発する試料が点光源であるとみなし得る程度に、チップ30の吸入口31に保持される試料の寸法が小さいことが好ましく、また、吸入口31は、そのような試料寸法にできる形状であるのが好ましい。光フィルタ52は、レンズ51によりコリメートされた光のうち蛍光成分を透過させる一方で励起光を遮断する。これにより、蛍光が選択的に取り出される。光検出器53は、光フィルタ52を透過した蛍光を受光し、この蛍光の強度に応じた電流信号を出力する。このような光検出器53としては、例えば、光電子増倍管やフォトダイオード等が適している。

[0045] モータ54は、光フィルタ52が取り付けられた円板55を回転させる。この円板55には、光フィルタ52として透過波長域が異なる複数のフィルタが設けられるのが好ましい。ただし、円板55には、光を遮断する遮蔽部が設けられていてもよく、また、そのまま光を通過させる開口部が設けられていてもよい。モータ54が円板55の回転方位を適切に設定することにより、試料から発せられた蛍光の波長に合わせて適切な透過波長域を有する光フィルタ52が選択される。なお、円板55に遮蔽部や開口部が設けられている場合、モータ54が円板55の回転方位を適切に設定することにより、光検出器53への光の入射を遮断する遮蔽部が選択されるが、あるいは試料から到達した光をそのまま光検出器53へ入射させる開口部が選択される。このように、光軸上から

光フィルタ52を待避させたり、あるいは光軸上に開口部が位置する場合、この第1実施例に係る蛍光測定装置1は吸光度測定にも用いられ得るので、等しい条件下における蛍光測定データ及び吸光度測定データを得ることができる。なお、光フィルタ52が取り付けられた円板55は、手動によって回転させてもよい。

[0046] 次に、この第1実施例に係る蛍光測定装置1の動作について説明する。初めに、ピペット装置4にチップ30が装着され、試料容器からチップ30内に試料が計り取られて、該チップ30の吸入口31に試料が保持される。この試料としては、特に限定されるものではない。試料は、溶液状、半固体状又は固体状であってもよく、適当な溶媒を用いて蛍光測定を行い得る濃度に希釈されてもよい。より具体的には、尿サンプル、血液サンプル、体液サンプルや生体組織、核酸、蛋白質や塩基などの蛍光性物質や蛍光標識化合物等が生体試料として挙げられる。生体試料以外の試料としては、河川水、湖沼水、海水、水道水、雨水、焼却灰、廃棄物や環境中に含まれる動植物サンプルなど、環境試料が挙げられる。また、一般に使用される金属、セラミック、プラスチック、それらの抽出液や溶解液、ガスやそれらの吸収物など、さらには、合成された物質(分析サンプル)などの蛍光性物質や蛍光標識化合物も試料として挙げられる。そして、蛍光測定用試料としては、これら溶質として、適当な溶媒に溶解又は分散させたものを用いることができる。

[0047] 次に、チップ31の吸入口31に試料が保持された状態で、ピペット装置4が蛍光測定装置1の所定位置に配置される。図3には、この装着時の光学系が示されている。そして、光源41から励起光が出力される。励起光源41から出力された励起光は、レンズ42によりコリメートされ、このコリメートされた励起光がアパーチャ43を介してピペットアダプタ20の励起光導入窓23に入射する。励起光導入窓23を通過した励起光は、ピペットアダプタ20の内部空間20Aに設けられた反射鏡24により反射される。そして、反射された励起光は、チップ30内に収容されている試料に対して液面上方から照射される。

[0048] この励起光照射に起因して試料から蛍光が発生する。この蛍光は、全ての方向に放射され、その一部がチップ30の吸入口31から外部へ出力される。その蛍光のうち下方に放射され、かつレンズ51に入力した成分がレンズ51によりコリメートされる。コ

リメートされた成分が光フィルタ52に垂直入射し、この光フィルタ52を透過した成分のみが光検出器53に受光される。そして、この受光された蛍光の強度に応じた電流信号が光検出器53から出力される。光検出器53から出力された電流信号はさらに電圧信号に変換され、この電圧信号が例えばコンピュータにより解析される。なお、試料に照射された励起光の一部は、試料を透過して、入射方向と同一の方向に出射されるが、光フィルタ52により遮断される。したがって、光検出器53へ入射する励起光の光量は極僅かである。

[0049] 以上の動作を経て蛍光測定が終了すると、ピペット装置4に装着されたチップ30に容れられた蛍光測定用の試料は、目的の反応容器に移される。したがって、試料を回収するステップを省くことができ、回収に伴う試料のコンタミネーションの発生が回避され、また、高価な蛍光測定用のセルが不要であって、微量試料の蛍光測定が迅速に行われる。また、安価な市販のチップ30が適用可能であるため、使用後のチップ30を廃棄することもできる。さらに、励起光は、断面形状が円形であるチップ30の側方から照射されるのではなく、試料の液面の上方から照射されるので、チップ30による励起光の散乱が小さい。このように、第1実施例に係る蛍光測定装置1は、短時間で容易に微量試料の蛍光測定を可能にする。

[0050] 次に、この発明に係る蛍光測定装置の第2実施例について説明する。図4は、この発明に係る蛍光測定装置の第2実施例の構成を示す図である。この図4に示された蛍光測定装置2は、上述のピペット10、ピペットアダプタ20及びチップ30に加えて、励起光源41、レンズ42、アパーチャ43、ダイクロイックミラー44及び光検出器53を備える。

[0051] 図3に示された第1実施例に係る蛍光測定装置1と比較すると、この第2実施例に係る蛍光測定装置2は、レンズ51、光フィルタ52及びモータ54を備えていない点、ダイクロイックミラー44を備えている点で異なるとともに、光検出器53が設けられている位置が異なる。ダイクロイックミラー44は、アパーチャ43とピペットアダプタ20の励起光導入窓23との間の励起光の光路上に斜めに設けられ、励起光を透過させるとともに、蛍光を反射する。光検出器53は、ダイクロイックミラー44により反射された蛍光を検出する。

- [0052] 次に、この第2実施例に係る蛍光測定装置2の動作について説明する。初めに、ピペット装置4にチップ30が装着され、試料容器からチップ30内に試料が計り取られる。このとき、計り取られた試料はチップ31の吸入口31に保持され、この状態を維持したままピペット装置4は蛍光測定装置2の所定位置に配置される。図4には、この装着時の光学系が示されている。そして、光源41から励起光が出力される。励起光源41から出力された励起光は、レンズ42によりコリメートされる。コリメートされた励起光は、アパーチャ43、ダイクロイックミラー44を順次透過し、ピペットアダプタ20の励起光導入窓23に入射する。励起光導入窓23を透過した励起光は、ピペットアダプタ20の内部空間20Aに配置された反射鏡24により反射される。反射された励起光は、チップ30内に收容されている試料に対して液面上方から照射される。
- [0053] この励起光照射に起因して試料から発せられた蛍光は、全ての方向に放射される。その蛍光のうち上方(励起光照射方向と逆の方向)に放射された成分は、反射鏡24により反射される。この反射された成分(蛍光の一部)は、励起光導入窓23を透過し、ダイクロイックミラー44に到達する。そして、このダイクロイックミラー44により反射された成分のみが光検出器53に受光される。そして、この受光された蛍光の強度に応じた電流信号が光検出器53から出力される。光検出器53から出力された電流信号は電圧信号に変換され、この電圧信号が例えばコンピュータで解析される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は、蛍光とともにダイクロイックミラー44に入射するが、このダイクロイックミラー44を透過する。したがって、光検出器53へ入射する励起光の光量は極僅かである。
- [0054] この第2実施例に係る蛍光測定装置2も、上述の第1実施例に係る蛍光測定装置1と同様の効果を奏する。加えて、この第2実施例に係る蛍光測定装置2は、光検出器53が受光する励起光及びその散乱光の光量が第1実施例と比較して極めて少ない点が優れている。
- [0055] 次に、この発明に係る蛍光測定装置の第3実施例について説明する。図5は、この発明に係る蛍光測定装置の第3実施例の構成を示す図である。この図5に示された蛍光測定装置3は、上述のピペット10、ピペットアダプタ20及びチップ30に加えて、励起光源41、レンズ42、アパーチャ43、レンズ51、光フィルタ52、光検出器53及び

モータ54を備える。

- [0056] 図3に示された第1実施例に係る蛍光測定装置1と比較すると、この第3実施例に係る蛍光測定装置3は、レンズ51、光フィルタ52、光検出器53及びモータ54が設けられている位置が異なる。この第3実施例では、レンズ51、光フィルタ52及び光検出器53は、反射鏡24から試料への励起光照射の光軸上とは異なる位置に配置されている。好ましくは、レンズ51から光検出器53に到るまでの検出光学系の光軸は、反射鏡24から試料への励起光照射の光軸に対して直交している。
- [0057] レンズ51は、チップ30の吸入口31に保持される試料から側方から到達した光をコリメートする。そのコリメートされた光が光フィルタ52へ入射する。光フィルタ52は、レンズ51によりコリメートされた光のうち蛍光を透過させる一方で励起光を遮断することで、蛍光を選択的に取り出す。光検出器53は、光フィルタ52を透過した蛍光を受光し、この蛍光の強度に応じた電流信号を出力する。
- [0058] なお、この第3実施例では、チップ30の吸入口31に保持される試料は励起光照射方向に沿って長いのが好ましく、吸入口31は、そのような試料寸法にできる形状であるのが好ましい。このように励起光が試料中を通過する距離が長くなると、試料における励起光吸収効率が高まり、蛍光の放出量が多くなる。このとき、蛍光を発する試料は、点光源ではなく、励起光照射方向に長い光源とみなし得る。したがって、レンズ51はシリンジカルレンズであるのが好ましい。また、光検出器53の有効な受光面も励起光照射方向に長いのが好ましい。また、この第3実施例では、試料から発せられた蛍光はチップ30を透過して光検出器53により検出されるので、チップ30は蛍光波長において透過率が高いのが好ましい。
- [0059] さらに、チップ30内に計り取られた試料が保持されている状態でチップ30は蛍光測定装置3の所定位置に再現性よく配置される必要がある。特にこの第3実施例では、蛍光を検出するための検出光学系がチップ30の側方にあるので、蛍光測定装置3におけるピペット装置4は高精度に配置されることが重要である。そのためには、上述のようなピペット装置4の蛍光測定装置3に対する固定方法に加え、チップ30の差込具合による蛍光測定位置の変動がないように、チップ30がピペット装置4のピペットアダプタ20に常に一定の位置で装着される必要がある。

[0060] そこで、チップ30自身あるいはピペットアダプタ20は、チップ30の装着位置を規定する位置決め構造をさらに備えるのが好ましい。このような位置決め構造としては、例えば、図6中の(a)に示されたように、チップ30の上端側に段差であるストッパ32が設けられるのが好ましい。この場合、チップ30に設けられた位置決め構造をとしてのストッパ32がチップ装着部22の先端に当接することでチップ30自身が一定の一で装着され得る。また、図6中の(b)に示されたように、位置決め構造として、ピペットアダプタ20におけるチップ装着部22の途中に段差であるストッパ22aが設けられてもよい。この場合も、チップ30の上端がストッパ22aに当接することでチップ30自身が一定の一で装着され得る。図6中の(a)及び(b)に示されたいずれの構造によっても、チップ30がピペットアダプタ20に対して常に一定の位置で装着される。

[0061] 次に、第3実施例に係る蛍光測定装置3の動作について説明する。初めに、ピペット装置4にチップ30が装着され、試料容器から計り取られた試料がチップ30の吸入口31に保持される。次いで、試料が吸入口31に保持された状態でピペット装置4は蛍光測定装置3の所定位置に配置される。図5には、この装着時の光学系が示されている。そして、光源41から励起光が出力される。励起光源41から出力された励起光は、レンズ42によりコリメートされる。コリメートされた光は、アパーチャ43を通過してピペットアダプタ20の励起光導入窓23に入射する。励起光導入窓23を透過した励起光は、ピペットアダプタ20の内部空間20Aに配置された反射鏡24により反射される。反射された励起光は、チップ30内に収容されている試料に対して液面上方から照射される。

[0062] この励起光照射に起因して試料から発せられた蛍光は、全ての方向に放射される。その蛍光のうち側方に放射されかつレンズ51に到達した成分(蛍光)は、レンズ51によりコリメートされる。このコリメートされた成分が光フィルタ52に垂直入射する。そして、光フィルタ52を透過した成分のみが光検出器53により受光され、この受光された蛍光の強度に応じた電流信号が出力される。光検出器53から出力された電流信号は電圧信号に変換され、この電圧信号が例えばコンピュータで解析される。なお、試料に照射された励起光の一部は試料により散乱されて、その散乱光の一部は、蛍光とともに光フィルタ52に入射するが、この光フィルタ52により遮断される。したがって、

光検出器53へ入射する励起光の光量は極僅かである。

- [0063] この第3実施例に係る蛍光測定装置3も、上述の第1実施例に係る蛍光測定装置1と同様の効果を奏する。加えて、この第3実施例に係る蛍光測定装置3では、光検出器53が受光する励起光の光量が極めて少なく、その一方で、光検出器53が受光する蛍光の光量が多い。そのため、蛍光検出のS/N比が優れている。また、蛍光測定装置3では、吸光度測定用の光学系(光フィルタ、光検出器)をチップ30の下方に設けておけば、蛍光測定及び吸光度測定を同時に行うことができる。
- [0064] 次に、上述の各実施例に係る蛍光測定装置1〜3に適用されるピペットアダプタの変形例について説明する。図7は、ピペットアダプタの変形例の構成を示す断面図である。この図7に示されたピペットアダプタ120は、ピペット10の先端が挿入されるピペット装着部121と、チップ30が装着されるチップ装着部122とを有しており、ピペット10とチップ30との間に装着可能である。ピペットアダプタ120は、その装着時にピペット10及びチップ30それぞれの内部の空間と連絡する内部空間120Aを有している。ピペットアダプタ120とピペット10との間の接合、及び、ピペットアダプタ120とチップ30との間の接合は、チップ30内に試料を保持・静止させるため、共に気密性が高いことが必要とされる。このことから、ピペット装着部121及びチップ装着部122それぞれは、気密性に優れた材質である例えばゴム状物質や高分子でコーティングされていたり、また、特にピペット装着部121とピペット10の間においてゴム状物質からなるOリング等の気密性保持部材を挟み込んでいたりするのが好ましい。
- [0065] また、ピペットアダプタ120は、光ファイバ123及びレンズ124を備える。光ファイバ123は、内部を伝搬してきた励起光を内部空間120Aに配置された一端から出力する。レンズ123は、光ファイバ123の該一端から出力された励起光を平行光に変換する。この平行光に変換された励起光は、チップ装着部122の開口を経てチップ30の吸入口31に向けて照射される。なお、この変形例においても、第1実施例と同様に、内部空間120Aに導入された励起光のうち所定波長帯域の成分のみを選択的に透過させる光フィルタとして、バンドパスフィルタが該ピペットアダプタ120の内部空間120Aに配置されてもよい。また、光ファイバ123の先端は、球状レンズ又はセルフオクレンズとなっているのが好ましい。この場合、レンズ124は不要である。

[0066] この図7に示されたピペットアダプタ120は、ピペットアダプタ20に替えて上述の蛍光測定装置1〜3それぞれに適用可能である。このようなピペットアダプタ120が適用された場合、光源40から出力された励起光は、光ファイバ123の他端(ピペットアダプタ120の外部に位置する光ファイバ123の端部)から入力され、光ファイバ123の内部空間120A内に位置する一端から向かって該光ファイバ123内を伝搬する。そして、光ファイバ123の一端から出射された励起光は、上述のようにチップ30内の試料に照射される。

[0067] この発明は、上述の実施例に限定されるものではなく、種々の変形が可能である。例えば、第1及び第3実施例それぞれに係る装置は、試料から発せられる化学発光の定量等にも適用が可能である。また、各実施例に係る装置を組み合わせ、例えば、第1実施例に係る装置で試料からの前方散乱光を検出し、第3実施例に係る装置で試料からの側方散乱光を検出して、これらの結果を解析することにより試料の特性の分析が可能である。

[0068] 次に、上述の第3実施例に係る蛍光測定装置3を用いた蛍光測定について説明する。試料容量は20 μ lであり、試料濃度を4段階に変えて、それら各濃度の試料について、蛍光測定装置3を用いてその蛍光を5回測定した。蛍光測定の1回毎に、ピペット装置4を蛍光測定装置3に装着して測定し、測定終了後にピペット装置4を蛍光測定装置3から取り外した。

[0069] 図8は、第3実施例に係る蛍光測定装置3を用いた蛍光測定の結果を示すグラフである。なお、図8の横軸は試料濃度を示し、縦軸は蛍光強度を示す。図8に示されたグラフから分るように、この蛍光測定における試料の濃度範囲では、測定された蛍光強度は、試料濃度に対して略線形関係にあり、しかも、優れた再現性が示された。

[0070] 以上の本発明の説明から、本発明を様々に変形しうることは明らかである。そのような変形は、本発明の思想及び範囲から逸脱するものとは認めることはできず、すべての当業者にとって自明である改良は、以下の請求の範囲に含まれるものである。

産業上の利用可能性

[0071] この発明は、医薬品工業、食品工業、化学工業及び農林水産業等の幅広い分野において、新薬の研究開発、酵素のスクリーニング、生理活性物質等の生体内微量

機能物質の分析等を行う際の蛍光測定に適用可能である。

請求の範囲

- [1] 励起光を出力する励起光源と、
第1内部空間を有するピペットと、
第2内部空間を有するチップであって、前記励起光の照射により所定波長の蛍光を発する試料を吸入する吸入口が先端に設けられたチップと、
前記ピペットと前記チップとの間に配置されるとともに、前記ピペットの第1内部空間と前記チップの第2内部空間とを連絡する第3内部空間を有するピペットアダプタであって、前記励起光源から前記第3内部空間内に射出された励起光を前記チップの吸入口に導くための励起光導入構造を有するピペットアダプタと、そして、
前記チップの吸入口を介して吸入された試料から発せられた蛍光を検出する蛍光検出システムを備えた蛍光測定装置。
- [2] 請求項1記載の蛍光測定装置は、
前記チップと前記蛍光検出システムとの間に配置され、前記試料から発せられた蛍光を前記蛍光検出システムに導くための第1光学系を備える。
- [3] 請求項1記載の蛍光測定装置において、
前記励起光導入構造は、前記ピペットアダプタの外部から前記第3内部空間内に前記励起光を導入する励起光導入窓と、そして、
前記励起光導入窓を介して前記第3内部空間へ導入された前記励起光を前記チップの吸入口に向けて反射させるための反射鏡を含む。
- [4] 請求項1記載の蛍光測定装置において、
前記励起光導入構造は、前記励起光が伝搬する光ファイバであって、前記ピペットアダプタの外部から前記第3内部空間内に先端部分が挿入され、前記内部空間に位置する一端から前記励起光を前記チップの吸入口に向けて射出する光ファイバを含む。
- [5] 請求項4記載の蛍光測定装置は、さらに、
前記光ファイバの一端と前記チップの吸入口との間に配置され、前記光ファイバの一端から射出された前記励起光を集光する第2光学系を備える。
- [6] 請求項1記載の蛍光測定装置において、

前記励起光導入構造は、前記ピペットアダプタの外部から前記第3内部空間内に導入される前記励起光のうち所定波長帯域の成分のみを、選択的に前記チップの吸入口に向けて照射する第1光フィルタを含む。

[7] 請求項1記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光検出システムは、前記試料から到達した光のうち蛍光を選択的に分離するための蛍光分離部と、該蛍光分離部により分離された蛍光を検出する光検出器とを含む。

[8] 請求項7記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光分離部は、前記励起光源から前記励起光導入構造を介して前記チップの吸入口に向かう前記励起光の光軸上であって前記チップの外部に配置され、前記試料から発せられた蛍光を選択的に透過させる第2光フィルタを含み、

前記光検出器は、前記第2光フィルタを透過した蛍光を検出する。

[9] 請求項8記載の蛍光測定装置は、さらに、

前記励起光の光軸上に配置された前記第2光フィルタを該励起光の光軸から外れた位置に待避させるための構造を備える。

[10] 請求項7記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光分離部は、前記励起光及び前記試料から発せられた蛍光の一方を透過するとともに、他方を反射するダイクロイックミラーを含む。

[11] 請求項10記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光分離部は、前記励起光源と前記励起光導入構造との間に配置され、前記励起光を透過させる一方、前記試料から発せられた蛍光を反射するダイクロイックミラーを含み、

前記光検出器は、前記ダイクロイックミラーにより反射された蛍光を検出する。

[12] 請求項7記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光分離部は、前記チップの外部であって前記励起光源から前記励起光導入構造を介して前記チップの吸入口に向かう前記励起光の光軸から外れた位置に配置され、前記試料から発せられた蛍光を選択的に透過させる第3光フィルタを含み、

前記光検出器が、前記第3光フィルタを透過した蛍光を検出することを特徴とする請求項6記載の蛍光測定装置。

[13] 請求項8記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光検出システムは、前記チップと前記第2光フィルタとの間に配置され、前記試料から発せられた蛍光の少なくとも一部をコリメートするコリメート光学系をさらに含む。

[14] 請求項12記載の蛍光測定装置において、

前記蛍光検出システムは、前記チップと前記第3光フィルタとの間に配置され、前記試料から発せられた蛍光の少なくとも一部をコリメートするコリメート光学系をさらに含む。

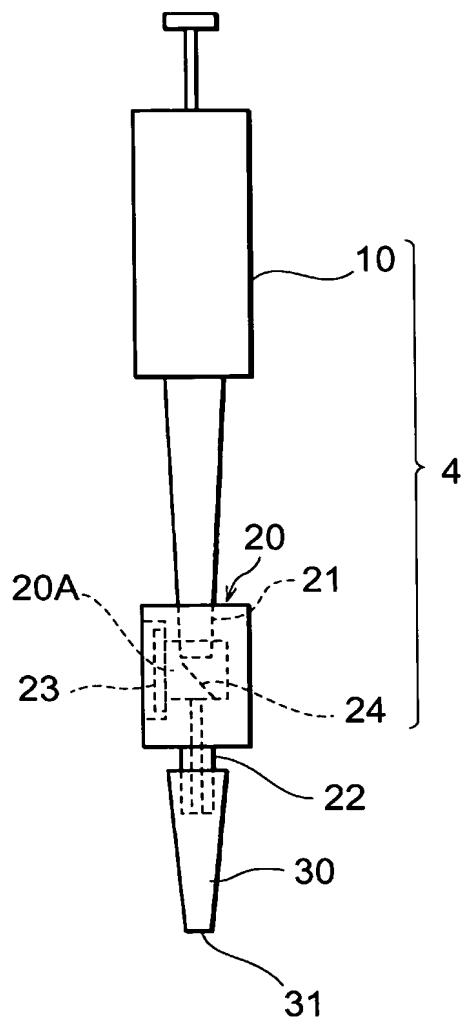
[15] 請求項1記載の蛍光測定装置において、

前記ピペットアダプタは、前記チップの装着位置を規定するための位置決め構造をさらに備える。

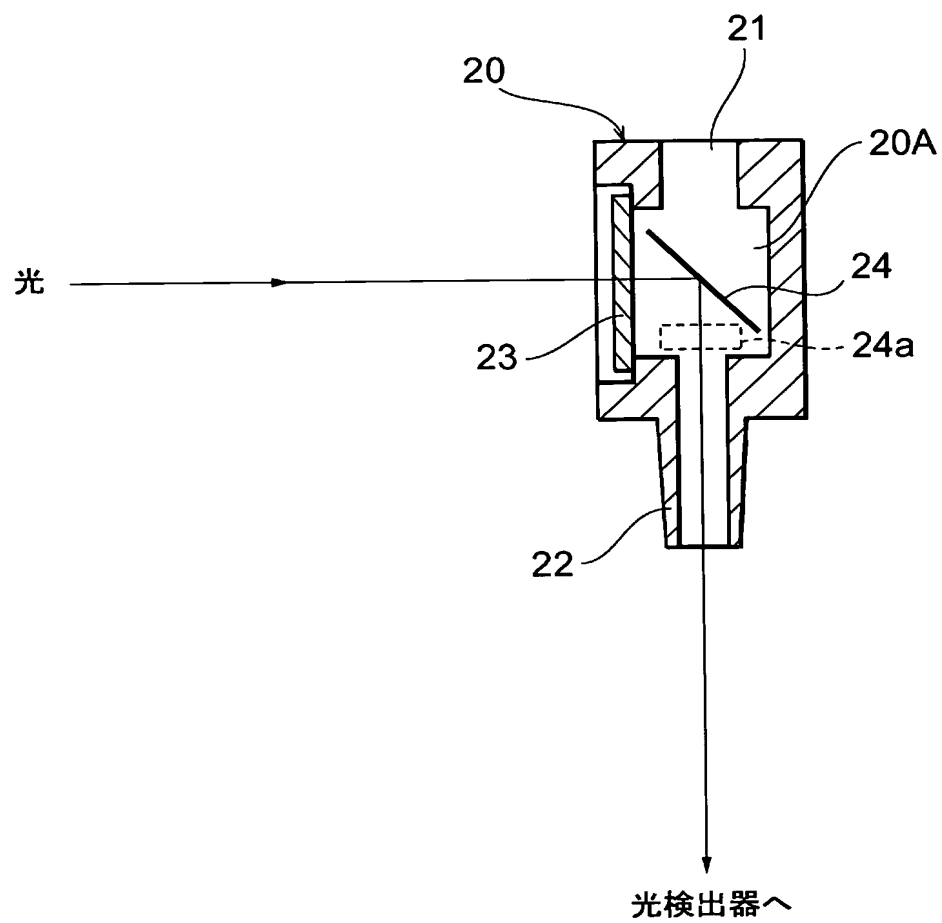
[16] 請求項1記載の蛍光測定装置において、

前記チップは、当該チップ自身の装着位置を規定するための位置決め構造をさらに備える。

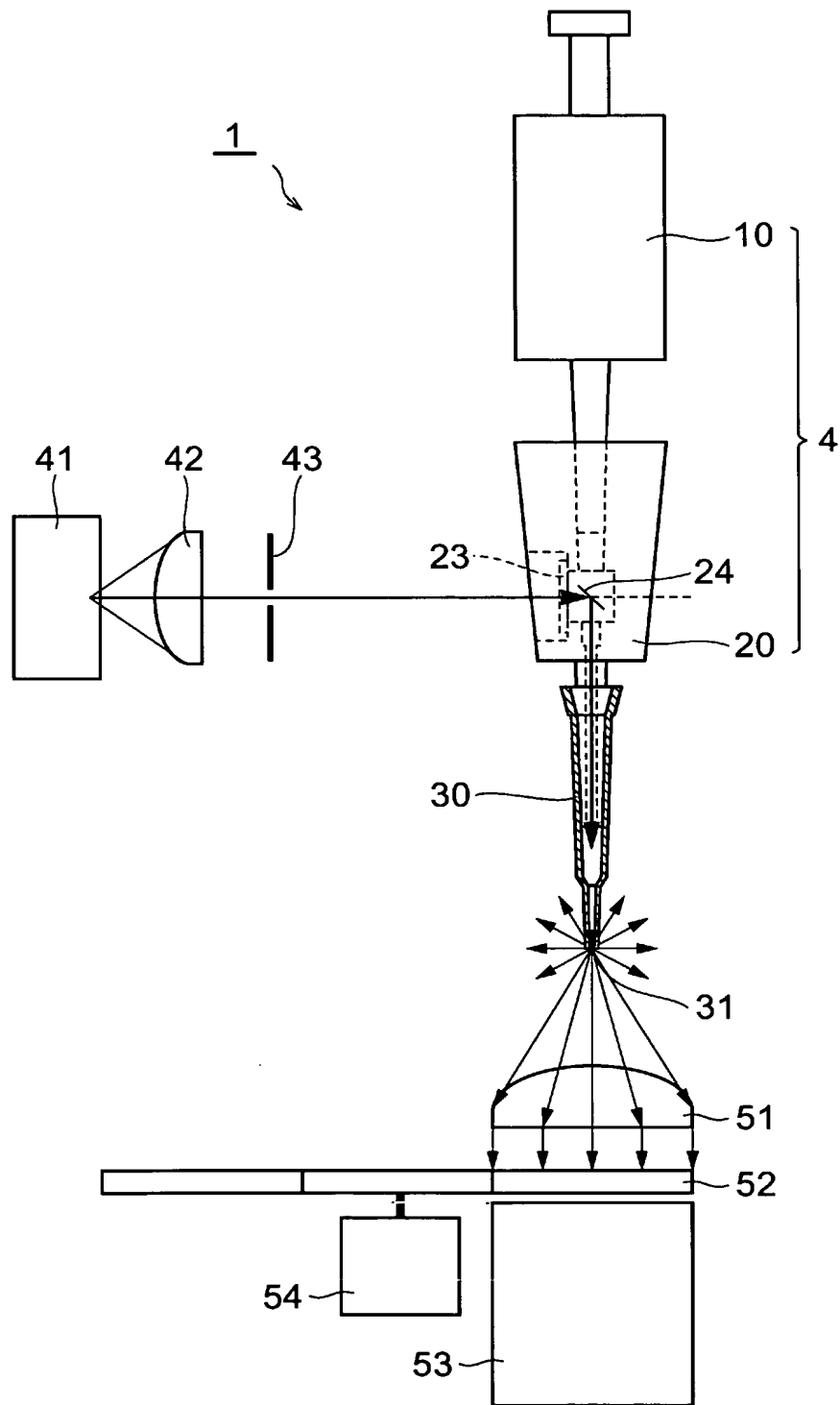
[図1]



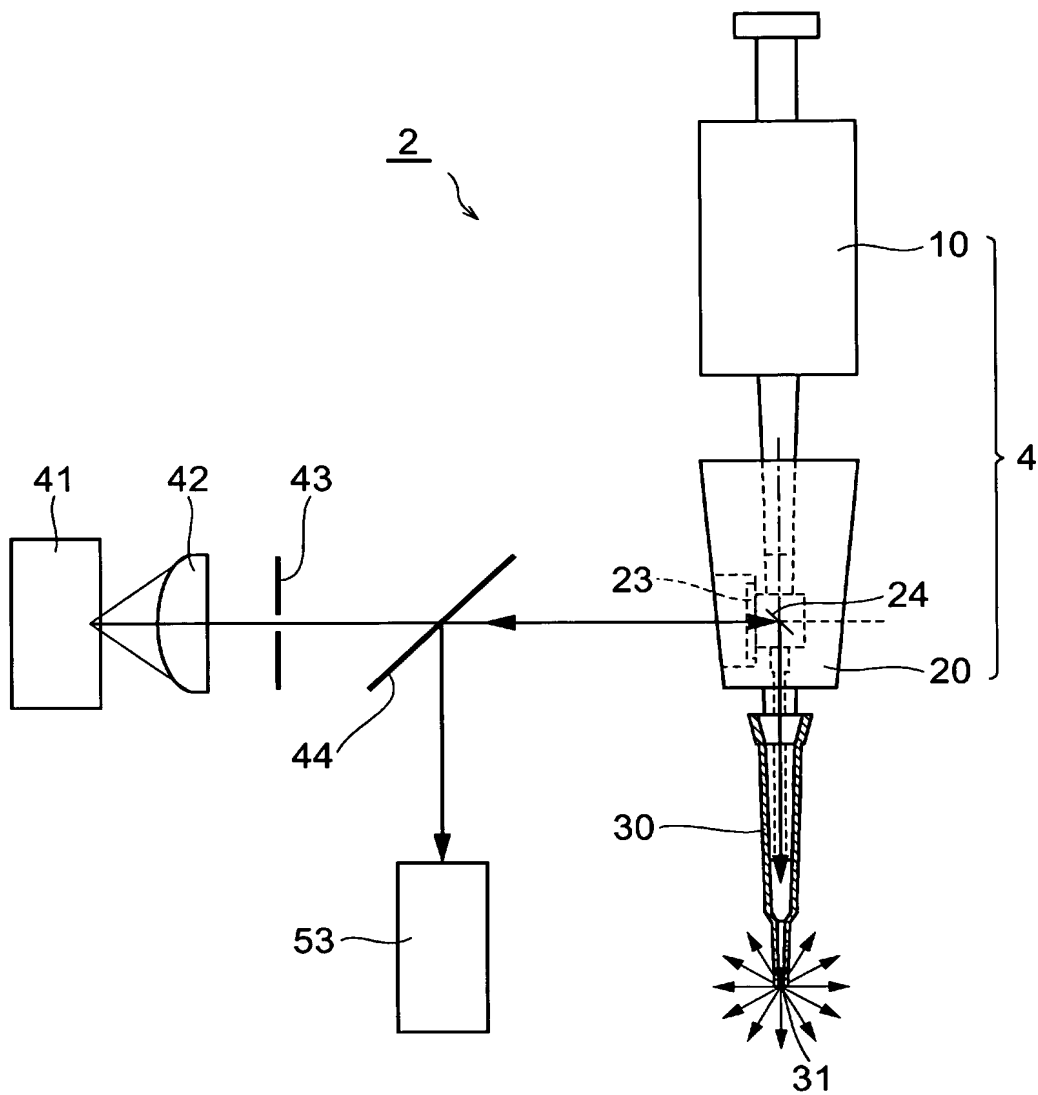
[図2]



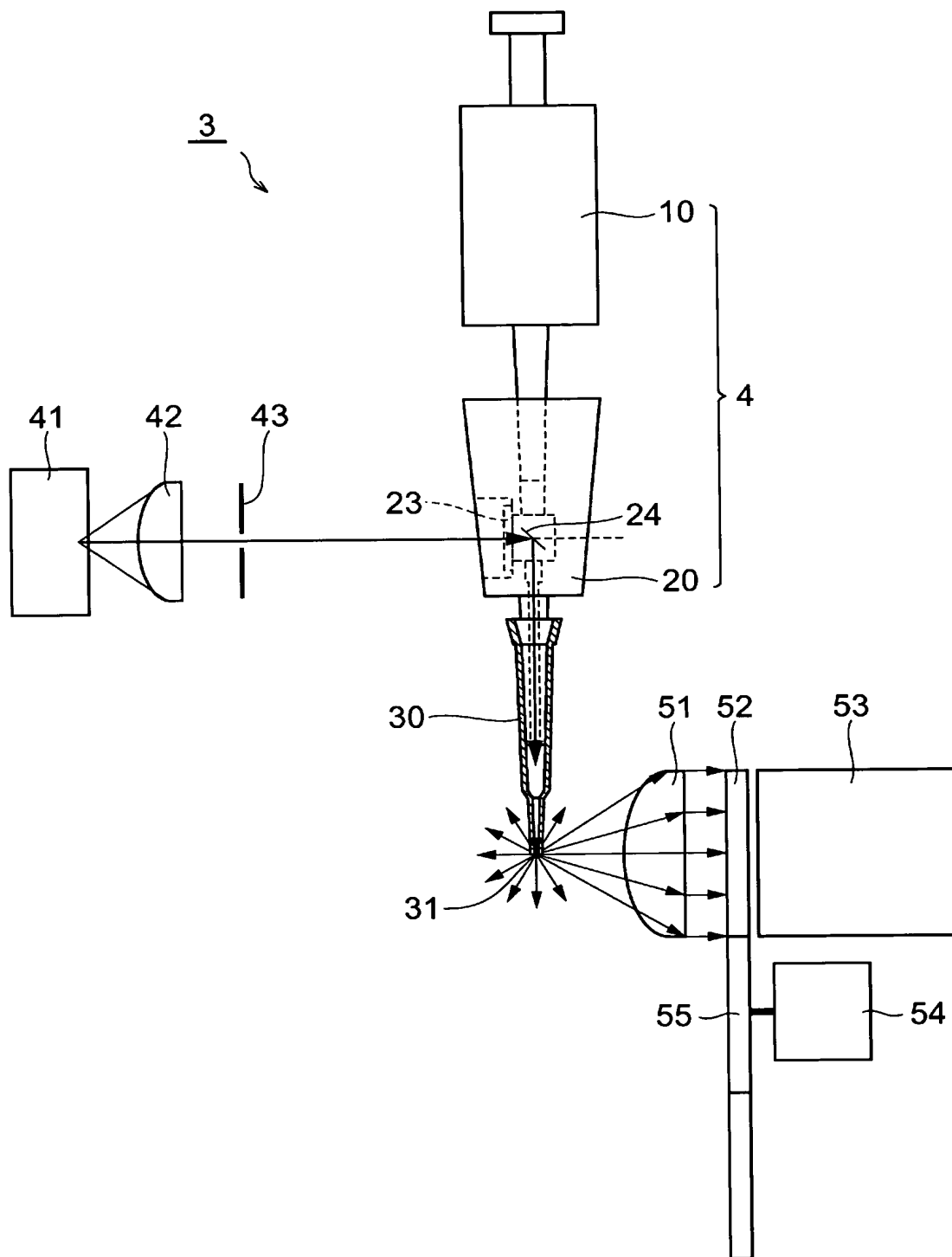
[図3]



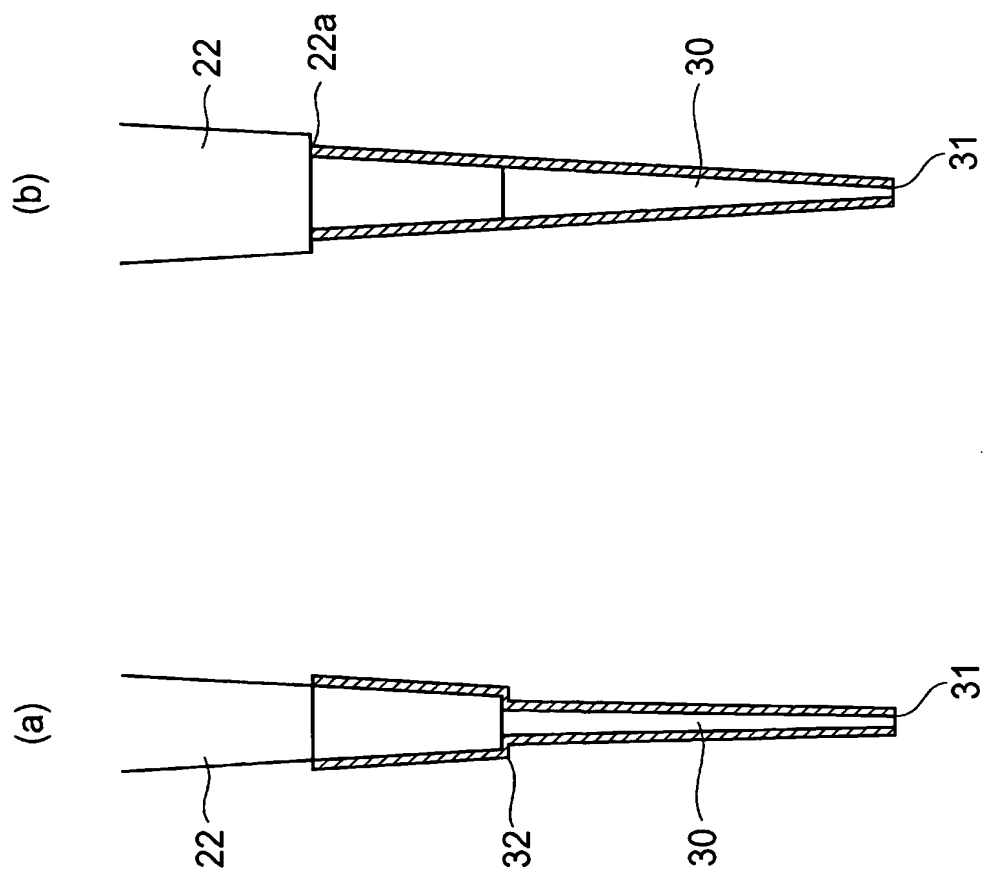
[図4]



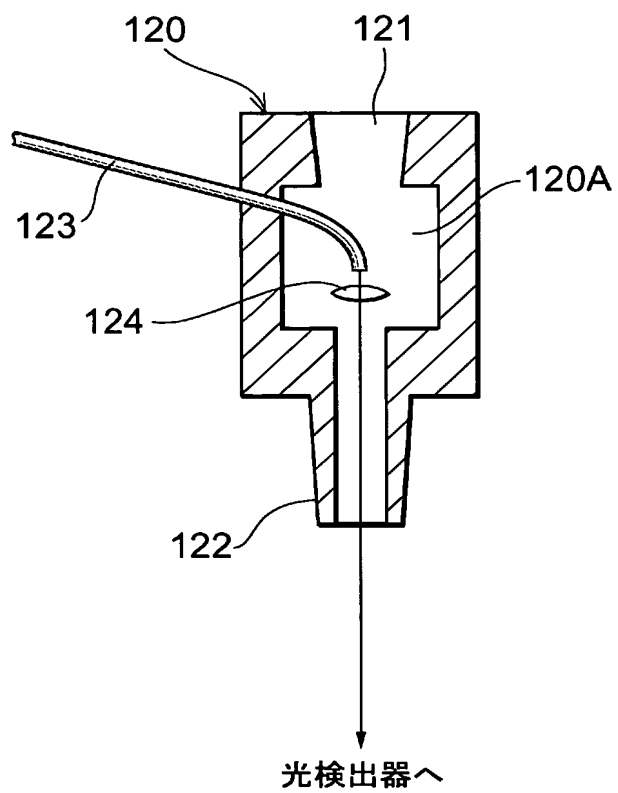
[図5]



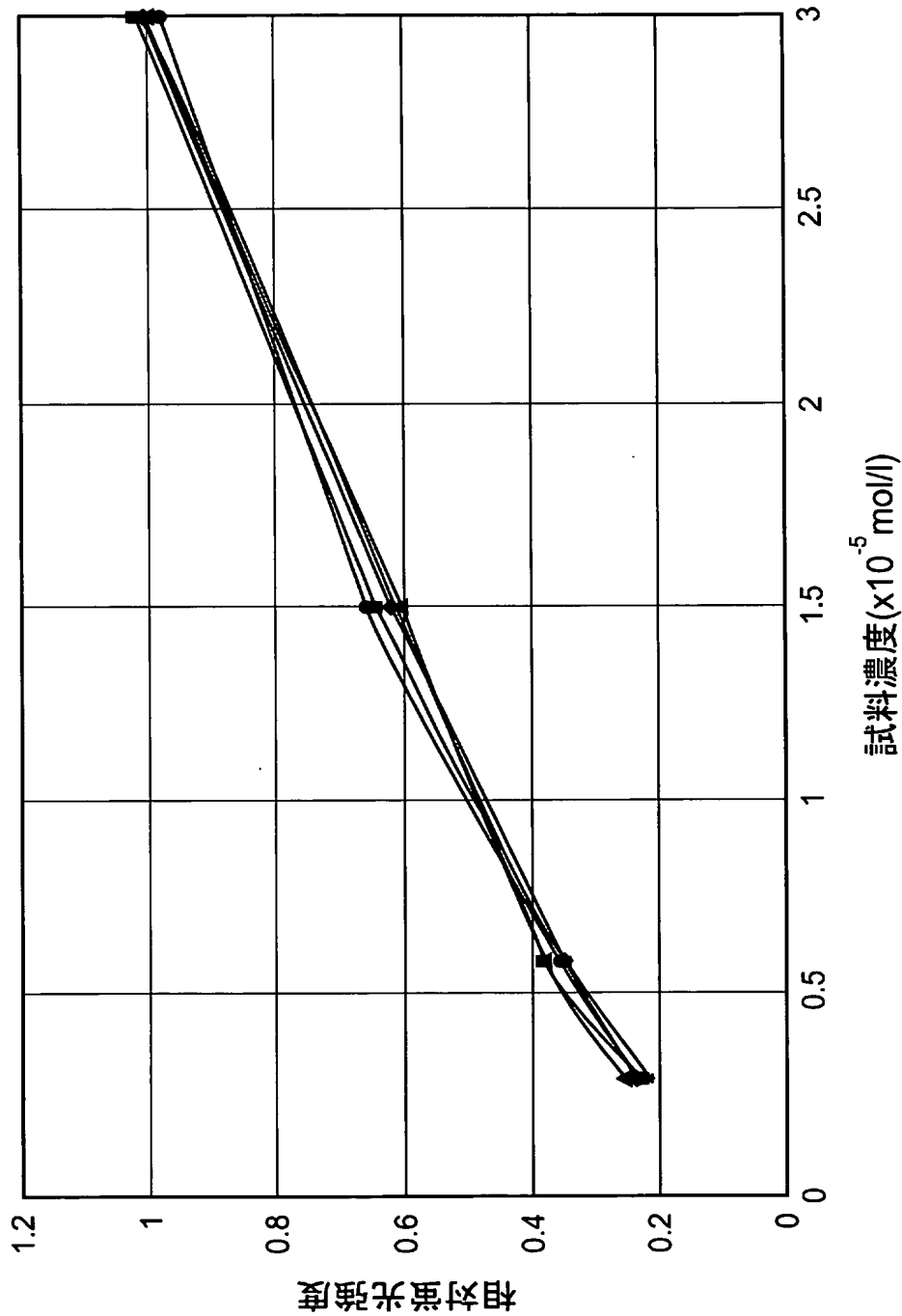
[図6]



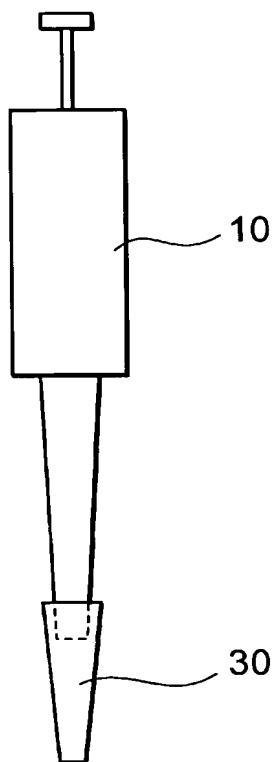
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N21/03

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N21/00-21/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2000/43751 A1 (Laboratory of Molecular Biophotonics), 27 July, 2000 (27.07.00), Full text; Figs. 1 to 10 & EP 1054250 A1 & US 6396584 B1	1-16
Y	JP 2002-71566 A (Hitachi, Ltd.), 08 March, 2002 (08.03.02), Full text; Figs. 5 to 9 & US 2002/0024018 A1	1-16
Y	JP 2003-52624 A (Richard Wolf GmbH.), 25 February, 2003 (25.02.03), Par. Nos. [0001], [0048], [0052], [0055] to [0058], [0065], [0069]; Figs. 1 to 4 & EP 1279364 A3 & US 2004/0019281 A1 & DE 10136191 A & CN 1398571 A	9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 November, 2004 (04.11.04)

Date of mailing of the international search report
22 November, 2004 (22.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015440

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5844686 A (Eppendorf-Netheler-Hinz), 01 December, 1998 (01.12.98), Full text; Figs. 1 to 8 & DE 19535046 A	1-16
A	CD-ROM of the specification and drawings annexed to the request of Japanese Utility Model Application No. 59336/1992 (Laid-open No. 16852/1994) (Shimadzu Corp.), 04 March, 1994 (04.03.94), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none)	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N21/03

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ G01N21/00-21/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2000/43751 A1 (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 2000.07.27, 全文, 第1-10図 & EP 1054250 A1 & US 6396584 B1	1-16
Y	JP 2002-71566 A (株式会社日立製作所) 2002.03.08 全文, 第5-9図 & US 2002/0024018 A1	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.11.2004

国際調査報告の発送日

22.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横井 亜矢子

2W

9706

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2003-52624 A (リチャード ウルフ ゲーエムベーハー) 2003.02.25, 段落番号【0001】, 【0048】, 【0052】, 【0055】-【0058】, 【0065】, 【0069】, 第1-4図 & EP 1279364 A3 & US 2004/0019281 A1 & DE 10136191 A & CN 1398571 A	9
A	US 5844686 A (Eppendorf-Netheler-Hinz) 1998.12.01 全文, 第1-8図 & DE 19535046 A	1-16
A	日本国実用新案登録出願4-59336号 (日本国実用新案登録出願公開6-16852 号) の願書に添付した明細書及び図面の内容を記載したCD-ROM (株式会社島津製作所) 1994.03.04, 全文, 第1-5図 (ファミリーなし)	1-16